

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Recherche par double-hybride de nouveaux partenaires potentiels du complexe SAGA chez *Saccharomyces cerevisiae*

Priels, Celine

Award date:
2003

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**Recherche par double - hybride de nouveaux partenaires potentiels
du complexe SAGA chez *Saccharomyces cerevisiae***

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Céline Priels

Juin 2003

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR
Téléphone : + 32(0)81.72.44.18 – Téléfax : + 32(0)81.72.44.20
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Recherche par double – hybride de nouveaux partenaires potentiels du complexe SAGA chez
Saccharomyces cerevisiae.**

PRIELS Céline

Résumé

La chromatine des eucaryotes est une structure d'empaquetage de l'ADN chromosomique, exerçant un rôle répresseur sur la transcription des gènes. Cependant, cet effet constitutif est modulable par des changements conformationnels de la structure chromatinienne. On sait de longue date que les zones chromosomiques où la transcription est activée sont plus « ouvertes » que les zones muettes. Plus récemment, on a identifié les modificateurs spécifiques intervenant sur les acides aminés histoniques et sur des bases nucléiques. Les modifications des histones obéissent à ce qu'on appelle le « code des histones » entendant par-là que les patterns de modification particuliers répondent à des états d'activation ou de répression de certains gènes ou régions chromosomiques.

Le complexe protéique SAGA, conservé de la levure à l'homme, est un des acteurs de ces modifications. Notamment, il réalise l'acétylation de l'extrémité amino – terminale des histones, composants du nucléosome. On sait qu'il en résulte une décondensation de la chromatine qui « facilite » le passage de la polymérase sans que le processus soit bien compris.

Afin de mieux comprendre le rôle de ce complexe SAGA, il est nécessaire d'analyser les fonctions de différents composants. On distingue classiquement de manière assez arbitraire en trois groupes protéiques qui sont Gcn5 et les protéines Ada, les Tafs et les Spt (Spt7, Spt8, Spt3 et Spt20).

Nous nous intéressons à la fonction biologique du complexe et des composants.

Nous adressons la question de savoir quels sont les partenaires des protéines qui composent la complexe SAGA afin, dans un deuxième temps, de trouver leur fonction biologique au cours de la transcription.

L'approche suivie sera double, biochimique dans un premier temps et ensuite génétique.

Nous réaliserons d'abord, par des cribles double-hybride, la recherche de partenaires potentiels des protéines du complexe. Ensuite, nous procéderons à une analyse génétique classique (analyse de mutants, mise à jour d'interaction génétique : suppression, colétalité.....)

Le présent projet se focalise plus particulièrement sur les protéines Spt7, Spt8 et Gcn5 et sur l'approche double-hybride.

Mémoire de licence en sciences biologiques.

Juin 2003

Promoteur : Professeur J .Vandenhoute.

Abréviations employées

3AT	3-AminoTriazole
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
APS	Persulfate d'Ammonium
ARN	Acide RiboNucléique
°C	Degré centigrade
DO	Densité Optique
EDTA	EthylèneDiamine-TétraAcétate
g	Gramme
kV	KiloVolt
l	Litre
LB	Milieu de Luria-Bertani
mA	Milliampère
μF	Microfaraday
mg	Milligramme
μg	Microgramme
min	Minute
ml	Millilitre
μl	Microlitre
mM	Millimolaire
nm	Nanomètre
nt	Nucléotide
ORF	Open Reading Frame , phase ouverte de lecture.
O/N	Over Night, toute la nuit
pb	Paire de Bases
PCI	Phénol, Chloroforme, alcool Isoamylique
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	PolyEthylène Glycol
rpm	Rotation par minute
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
sec	Seconde
SS-DNA	ADN de sperme de saumon
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TE	Tris-EDTA
Temed	N,N,N',N'-Tétra-Méthyl-Ethylène Diamine
Tris	Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
UV	Ultra-Violet
w/o	Without
X-Gal	5-bromo 4-chloro 3-indoyl, β-D-galactopyranoside.
Ω	Ohm

Table des matières.

Résumé

Introduction

1.Brève description de la machinerie transcriptionnelle 1

1.1 Généralités. 1

1.2 Les étapes clés du contrôle de la transcription. 1

1- L'initiation est la première étape du mécanisme. 1

2- L'élongation est la phase durant laquelle l'ARN
est synthétisé en aval du promoteur. 2

2.Rôle de la chromatine dans la transcription. 2

2.1 Le code des histones 3

2.1.1 La méthylation 3

2.1.2 L'acétylation 4

2.2 Le complexe SAGA (Spt – Ada – Gcn5 – acétyltransférase). 4

Cadre du travail : Objectifs, voies et moyens

Cadre du travail : objectifs, voies et moyens. 6

1.Objectifs. 6

2.Voies et moyens.

2.1 La recherche d'interactants du complexe SAGA par double-hybride. 6

2.1.1 L'approche double-hybride. 6

2.1.2 Choix des protéines cibles du complexe SAGA prises comme appât
dans le double-hybride. 7

2.1.3 Le clonage GATEWAYTM. 8

Résultats

1.Vue d'ensemble de la procédure. 10

1.1 Construction des 5 appâts : Gcn5, Spt8, Spt7(1-1125), Spt7(1-873)
et Spt7(459-1332) par le clonage GATEWAYTM. 10

1.2 Test d'élimination des autoactivateurs. 11

1.2.1 Résultats du test d'élimination des autoactivateurs. 11

1.3 Expériences double-hybride pilotes pour Gcn5, Spt7(1-1125), Spt7(1-873)
et Spt7(459-1332). 11

2. Conclusions des résultats, discussions et perspectives du travail. 14

2.1 Résumé des résultats. 14

2.2 Discussions des expériences pilotes double-hybride. 14

2.3 Expériences complémentaires à envisager. 15

Matériels et méthodes

1. Matériels 16

1.1. Les tampons. 16

1.2. Les solutions. 16

1.3 Milieux de culture. 18

1.3.1. Milieux de culture bactérien. 18

1.3.1.1. Milieu LB liquide. 18

1.3.2. Milieux de culture pour les levures. 18

1.3.2.1. Milieu Casa liquide : milieu riche sans tryptophane, uracile, adénine, tyrosine 18

1.3.2.2 Milieu synthétique 18

1.3.2.3 Milieu synthétique + 3AT. 18

1.3.2.4 Milieu minimum M9. 19

1.4 Souches et plasmides. 19

1.4.1 Souches de bactéries 19

1.4.2 Souche de levure 20

1.4.3 Les plasmides 20

1.4.3.1 Le plasmide pDONR 202TM : 20

1.4.3.2 Le plasmide pGBT9, plasmide « appât » 20

1.4.3.3 Le plasmide pACTII , plasmide « proie » 20

2. Méthodes. 21

2.1 Clonage GatewayTM 21

2.1.1 Principe 21

2.1.2 En pratique 21

2.2 Techniques relatives à l'utilisation de bactéries. 22

2.2.1 Transformation des bactéries par électroporation 22

2.2.1.1 En pratique 22

2.3. Techniques relatives à l'utilisation de levures. 23

2.3.1. Transformation de levures. 23

2.3.1.1. Transformation par la technique au LiAc. 23

2.3.1.2. Méthode de transformation à grande échelle pour la banque double- hybride. 23

2.3.2. Coloration X-GAL(pour une petite boîte de Petri). 24

2.4 Techniques relatives à l'ADN. 24

2.4.1. Extraction d'ADN plasmidique de levures. 24

2.4.2 Minipréparation d'ADN plasmidique. 25

2.4.3. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose. 25

Bibliographie 26

Introduction

1.Brève description de la machinerie transcriptionnelle.¹

1.1 Généralités

Il existe trois ARN polymérases nucléaires pouvant être séparées biochimiquement (11). Ces trois polymérases ont des rôles spécifiques : l'ARN polymérase I (Pol I) est responsable de la transcription du pré-ARN ribosomique 35S, 18S, 25S et 5,8S. L'ARN polymérase II (Pol II) synthétise les précurseurs des ARN messagers et aussi d'autres petits ARN (Small Nuclear RNA et Small Nucleolar RNA). L'ARN polymérase III (Pol III) forme les ARN de transfert, l'ARN ribosomique 5S et les petits ARN non synthétisés par l'ARN polymérase II.

Le mécanisme de la transcription est arbitrairement divisé en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

1.2 Les étapes clés du contrôle de la transcription

I – L'initiation est la première étape du mécanisme de la transcription.

Elle consiste dans la formation du complexe de préinitiation (PIC) qui comprend l'ARN polymérase et des facteurs généraux de transcription qui sont recrutés au niveau du promoteur (Figure I1).

Un promoteur se compose de plusieurs boîtes, appelées éléments CIS, comme la boîte TATA. Cette dernière proximale est localisée en amont du site +1 initiateur de la transcription à des distances variables de 50 à 200 paires de bases. Cette séquence consensus n'est pas obligatoire pour le recrutement de la machinerie de transcription car il existe des promoteurs dépourvus de cette boîte.

Les protéines qui se lient à la boîte TATA du promoteur sont les facteurs généraux de transcription (GFT), au nombre de cinq : TBP (TATA Binding Protein), les Transcription Factors – II_B (TFII_B), TFII_F, TFII_E et TFII_H (5). Leur identification a été obtenue par analyse biochimique de leur aptitude à favoriser une reconnaissance des promoteurs par la polymérase II. La TBP purifiée biochimiquement avec des TAFs (Transcription Activating Factor), forme TFII_D qui s'associe avec TFII_B et TFII_A. Les TAFs associées à la TBP ont des activités très diverses comme une activité acétyltransférase sur les histones H3 et H4. Des expériences de lésions de l'ADN par irradiations suivies de tests de la réparation ont montré que TFII_H est impliqué dans la machinerie de réparation et dans la capacité de transcription de l'ARN polymérase.

Les UAS (Upstream Activating Sequence) et URS (Upstream Repressing Sequence), eux, sont des boîtes beaucoup plus distales qui ont un rôle activateur ou répresseur respectivement. Elles sont reconnues par des facteurs de transcription spécifiques (transactivateurs) qui interagissent avec la machinerie de transcription de manière directe ou indirecte. Dans ce dernier cas l'interaction se fait via un complexe de protéines appelé complexe médiateur /Srb ou par TFII_A. Un exemple de transactivateur est le facteur de transcription Gal 4 impliqué dans le métabolisme du glucose chez la levure.

En plus de tous ces facteurs « TRANS », beaucoup d'autres machineries sont impliquées dans la transcription, citons, la machinerie de maturation de l'ARN qui effectue la

¹ Ce chapitre s'inspire de l'ensemble des textes de synthèse produits au laboratoire dans le cadre de la thèse de Vincent Van Mullem. Plusieurs références consultées spécifiquement sont aussi mentionnées.

polyadénylation et l'épissage de l'ARN transcrit, les topoisomérases et hélicases modifiant le superenroulement de l'ADN.

Ou encore les complexes impliqués dans le réarrangement de la chromatine comme le complexe SWI/SNF, SAGA En effet, de manière simpliste, l'accès aux boîtes constituant le promoteur est affecté par la structure de la chromatine laquelle est soit sous forme condensée ou soit sous forme décondensée. La structure « ouverte » ou décondensée favorise le passage de la machinerie de transcription tandis que la structure chromatinienne condensée ou « fermée » la réprime.

2 - L'élongation de la transcription est la phase durant laquelle l'ARN est synthétisé en aval du promoteur.

Durant cette étape, l'ARN polymérase II est affectée par des contraintes physiques et des encombrements stériques de l'ADN qui peuvent conduire au ralentissement ou à l'arrêt de la polymérase (3).

Il existe 2 groupes de facteurs d'élongation qui modulent l'activité transcriptionnelle :

- Le premier groupe est responsable du changement de la vitesse de transcription de la polymérase par une augmentation catalytique de la synthèse ou par une diminution du nombre d'arrêts. Un exemple de facteur d'élongation est TFIIIF qui est impliqué au moment de l'initiation et peut rester accroché à la machinerie durant toute la transcription.

- Le deuxième groupe est constitué de TFIIIS essentiellement qui intervient pour stimuler la reprise de la synthèse après un arrêt transitoire (7).

La structure de l'ADN affecte également la vitesse d'élongation. Des protéines ont été isolées mais leur fonction exacte n'a pas encore été définie, ceci grâce à leur aptitude à effectuer des changements qui modifient la structure de la chromatine.

Que ce soit pendant l'initiation ou l'étape d'élongation, il semble bien établi que la structure de la chromatine influence le mécanisme de la transcription des gènes.

2. Rôle de la chromatine dans la transcription.

Le génome eucaryotique est empaqueté dans un état condensé (figure I2 (1)), appelé hétérochromatine. La chromatine est un assemblage de protéines et d'ADN en une structure de haut niveau permettant la compaction de plusieurs mètres d'ADN dans le noyau de cellules eucaryotiques. Cette structure « cœur » est composée de 2 copies de chaque protéine histone H2A, H2B, H3 et H4 formant un octamère autour duquel s'enroule 145 - 147 paires de bases d'ADN (9) (figure I2(2)). Il est montré que ces protéines sont très conservées.

La partie amino-terminale du cœur protéique des histones contient une région flexible et hautement basique. Cette extrémité est le site de différentes modifications post-transcriptionnelles. La forme chromatinienne très condensée, où les transactions avec les appareils de transcription, de réparation, de réplication de l'ADN et de recombinaison sont très réduites, est appelée hétérochromatine

La forme décondensée, appelée euchromatine, fournit un environnement plus favorable pour les processus se déroulant au niveau de l'ADN et nécessitant une interaction avec celui-ci. En effet, le décompactage de la chromatine facilite, par exemple, l'accès de l'ADN à l'ARN

polymérase II.. Un accès aux gènes semble nécessaire pour tous les mécanismes dont leur fonction est de répondre aux signaux extérieurs et aux événements cellulaires programmés. On comprend dès lors que la structure de la chromatine soit régulée ; c'est le rôle des différentes modifications qui s'opèrent sur les histones.

L'hypothèse du « code » des histones propose que des « patterns » spécifiques de modifications affectant des résidus particuliers des queues amino-terminales des histones sont corrélés à des régulations fines de l'expression des gènes (15).

Ainsi plusieurs régions du génome présentent des « patterns » similaires subissant le même contrôle global de l'information génétique.

Les recherches sur ce nouveau langage montrent que ces changements seraient établis dans un ordre bien précis mais on ignore encore le déclenchement et le déroulement exacte de ce processus.

2.1 Le code des histones.

On entend donc par « code des histones », des patterns de modification particuliers qui répondent à des états d'activation ou de répression de certains gènes ou régions chromosomiques.

Les premières études sur les translocations chromosomiques induites par des radiations UV ont permis de distinguer les états transcriptionnels « on – off ». Ceux-ci sont largement dépendants de la position du gène à l'intérieur d'un environnement chromatinien accessible (euchromatine) ou inaccessible (hétérochromatine).

Le code des histones est constitué des modifications covalentes qui peuvent altérer la structure de la chromatine qui incluent entre autre la méthylation, l'ADP – ribosylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation et, en particulier, l'acétylation de l'extrémité amino-terminale émergeant du nucléosome(8).

Les modifications réalisées par des enzymes sont effectuées sur des sites bien précis. Comme le montre la figure (I2(3)), dans le cas particulier de l'histone H3, l'acétylation se réalise sur la lysine 4 et la lysine 9 et pour la phosphorylation sur la sérine 10 et la sérine 28 (6).

Des études biochimiques ont démontré un lien direct fonctionnel entre la phosphorylation de la sérine 10 et l'acétylation de la lysine 14 sur l'histone H3. Ces 2 modifications se réalisent sur la même queue d'histone. Ces expériences montrent que l'acétylation *in vitro* de la lysine 14 augmente le niveau de pré – phosphorylation de la sérine 10. Un autre groupe de chercheurs a montré que, *in vivo*, la stimulation des cellules de mammifères par l' EGF (epithelial growth factor) a comme conséquence l'acétylation et la phosphorylation séquentielle de l'histone H3 et, de plus, ces histones modifiées sont généralement associées au promoteur c-fos activé par l'EGF (8).

Donc il s'avère que différentes modifications de la chromatine sont étroitement liées les unes aux autres dans un canevas bien précis.

Parmi les différentes modifications évoquées, la méthylation et l'acétylation seront développées succinctement ci-dessous. Mais d'autres, ne seront que citées, comme l'ubiquitinylation, la phosphorylation et l'ADP-ribosylation.

2.1.1 La méthylation.

La méthylation, bien qu'elle ait généralement une fonction répressive, peut induire des effets divergents au niveau de la transcription.

Par exemple, la famille de protéines SU(var) 3-9 chez *Tetrahymena* semble diriger la formation d'un état réprimé de la chromatine par la méthylation de la lysine 9 de l'histone

H3, mais ces protéines seraient aussi responsables de l'activation de la transcription par la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3.

Ces découvertes indiquent que la méthylation des histones, contrairement à ce qu'on a cru d'abord, peut aussi avoir un effet dans l'activation des gènes.

Il a été montré que la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 de *Saccharomyces cerevisiae* est dépendante de l'ubiquitinylation de l'H2B (12). Ceci permet de constater à nouveau une coordination dans le déroulement des modifications.

2.1.2 L'acétylation.

L'acétylation, qui est corrélée avec la compétence transcriptionnelle est réalisée par les HATs. Elle s'effectue sur les résidus lysines des queues amino – terminales des histones. Un bon exemple de ce phénomène est observé au locus de la β - globine des érythrocytes de poulets qui contient 33kb de chromatine accessible et qui est enrichi en histones hyperacétylées (8).

Parmi les histones acétyltransférases HATs qui ont été isolées sur base de leur aptitude à transférer un groupe acétyle de l'acetyl – coenzyme A vers des histones, on distingue deux groupes (HAT) :

- HAT du type B : ce groupe comprend les enzymes cytoplasmiques impliquées dans le transport vers le noyau des histones néosynthétisées.

- HAT du type A : ce groupe comprend les enzymes responsables des régulations liées à la compaction de l'ADN dans le noyau.

Dans ces deux groupes, des familles de HATs trouvées chez les eucaryotes, sont conservées de la levure à l'homme.

Par exemple, la famille des HAT Gcn5/PCAF(p300/CBP – associated factor) sont des co-activateurs pour un ensemble de gènes spécifiques tandis que la famille des HAT CBP/p300 sont des activateurs globaux de l'expression des gènes, c'est-à-dire, activant l'expression de tous les gènes.

Le processus de modulation de la structure chromatinienne le plus étudié et le mieux connu est l'acétylation des protéines histones par le complexe SAGA. L'acétylation des lysines de l'extrémité amino-terminale des protéines histones par effet de charge neutraliserait la partie extérieure du nucléosome pour produire une répulsion de l'ADN et une déstabilisation de la structure chromatinienne.

2.2.Le complexe SAGA (Spt – Ada – Gcn5 – acétyltransférase).

Le complexe SAGA est une protéine de 1, 8 MDa chez *Saccharomyces cerevisiae* qui a été isolée sur base de sa capacité à acétyler les histones. Il est nécessaire pour la transcription de 10% des gènes en décondensant la chromatine au niveau des locus de ces gènes et en permettant l'activation de la transcription. Il possède une activité HAT de type A et est constituée d'un assemblage de 15 sous – unités (Taf90, Taf61, Taf60, Taf25, Taf 17, Ada 1, Ada2, Ada3, Ada4, Ada5, Spt20, Spt8, Spt7, Spt3 et Gcn5 (2).

Des études génétiques et biochimiques permettent de les classer en 3groupes :

- Gcn5-Ada : Ce groupe de protéines tire son nom de la fonction dite « adaptation » du complexe SAGA à la chromatine. Notons que Gcn5 qui fait partie du complexe détient l'activité acétyltransférase (HAT). On sait que l'activité est modulée par la présence des protéines Ada2 et Ada3 (1). Au sein de ce groupe, on détecte des

interactions physiques entre Ada, entre Ada et TBP et aussi entre Ada et certains transactivateurs au niveau de leur domaine d'activation comme Gcn4. Il a été montré que le niveau d'activité de l'acétylation des nucléosomes par Gcn5 est en relation avec la croissance, la transcription et le remodelage de la chromatine *in vivo*. L'homologue de Gcn5 chez l'homme est p300/CBP.

- Spt : Ce groupe est constitué des protéines Spt3, Spt7, Spt8 et Spt20. Les protéines Spt ont été découvertes comme étant des suppresseurs des défauts causés par l'insertion d'éléments transposables dans le promoteur de gènes marqueurs (19). Ces protéines sont des éléments qui maintiennent la stabilité, c'est-à-dire l'intégrité structurale du complexe SAGA.

Différentes associations de protéines ont des rôles distincts comme :

- Spt3 et Spt8 qui ont un rôle dans l'initiation de la transcription en contrôlant la liaison de la TBP (TATA Binding Protein) aux régions TATA.
 - Spt7 et Spt20 qui ont un rôle important pour le maintien de l'intégrité du complexe SAGA.
- TAFs : Ce groupe est constitué des TBP – Associated – Factors qui sont des protéines possédant une diversité de fonctions. On constate notamment des interactions avec les TBP ou avec les autres sous-unités du complexe SAGA.

Cet ensemble de données suggère que SAGA possède au moins 2 fonctions biochimiques qui sont l'acétylation des histones et l'interaction avec les TBP pour contribuer ainsi à la régulation transcriptionnelle. Une étude récente a montré que SAGA serait un activateur d'interaction.

Alors que la régulation de la transcription par SAGA est fortement étudiée, le contrôle de son assemblage et les associations protéine – protéine à l'intérieur du complexe le sont beaucoup moins.

Il est certain que la connaissance des partenaires d'interactions potentiels de différentes sous – unités du complexe SAGA est une clé pour la meilleure compréhension du rôle fonctionnel de celui-ci.

Cadre du travail : Objectifs, voies et moyens

Cadre du travail : objectifs, voies et moyens.

1.Objectifs.

Le thème central du laboratoire vise les interactions protéine-protéine qui sont impliquées dans la transcription et plus précisément dans les étapes d'initiation et d'élongation. Notre projet s'inscrit dans ce contexte et consiste à rechercher les partenaires d'interactions des sous-unités du complexe SAGA.

2.Voies et moyens.

2.1 La recherche d'interactants du complexe SAGA par double-hybride.

2.1.1 L'approche double – hybride.

Le double-hybride est une approche moléculaire, mise au point par Fields et Song en 1989, permettant la mise en évidence de l'interaction *in vivo* entre deux protéines (4). Ce système se base sur la division des transactivateurs (exemple GAL4) en deux domaines fonctionnels distincts : le domaine de liaison à l'ADN ou BD et le domaine de transactivation ou AD (Figure I3(A)).

Le domaine de transactivation n'étant pas capable de se fixer à l'ADN et le domaine de liaison à l'ADN ne pouvant à lui seul activer la transcription, la séparation physique de ces deux domaines entraîne une perte de fonction du transactivateur (Figure I3(B)).

Dans le système du double-hybride, repris dans la figure I3(C) le domaine BD de liaison à l'ADN est fusionné à une protéine d'intérêt X tandis que le domaine d'activation AD est fusionné à une protéine Y. Dans ce cas, un complexe activateur pourra être reconstitué si, et seulement si, X interagit physiquement avec Y. La capacité de transactivation du facteur sera mise en évidence par la transcription de gènes rapporteurs. Dans ce travail les gènes rapporteurs utilisés sont *HIS3* et *LacZ*.

Le système double-hybride permet donc de tester aisément des interactions supposées, et ce, *in vivo*. La puissance de ce système permet aussi de tester toutes les interactions potentielles d'une protéine avec l'ensemble d'un protéome. Par cette méthode double-hybride, nous nous proposons de chercher les partenaires potentiels d'interaction, des différents composants du complexe SAGA, au sein et à l'extérieur du complexe.

Dans notre travail, des protéines du complexe SAGA ont été choisies et testées lors de plusieurs essais de la technique double-hybride contre des fragments de banque d'ADN génomique fusionnés au domaine d'activation Gal 4.

2.1.3 Choix des protéines du complexe SAGA prises comme appât dans le double-hybride.

Spt7 est une protéine de 1332 acides aminés, chargée négativement (Figure I4). Elle se compose de 2 régions :

- La première est structurellement semblable à l'« histone fold » qui est un motif d'interaction s'étendant de l'acide aminé 979 à l'acide aminé 1045. Cette région est souvent impliquée dans des interactions avec les histones ou d'autres partenaires impliqués dans leur réarrangement.
- La deuxième, communément appelé « bromodomaine » est un domaine long de 110 acides aminés. Il est trouvé dans beaucoup de protéines associées à la chromatine car il se lie aux lysines acétylées.

Une région de Spt7 a été délimitée comme interagissant avec la protéine Spt8 par l'analyse d'un ensemble de mutants de Spt7 délétés partiellement (18).

Le rôle de Spt7 est reconnu pour l'intégrité du complexe SAGA, elle semble impliquée dans la régulation de certaines sous-unités telles que Spt20 et Ada1.

Lors de ce travail, des versions tronquées de la protéine Spt7 native ont été utilisées (Figure I4). (18)

Ces différents fragments¹ sont :

- Spt7 (1– 873) : il s'agit d'une version tronquée du côté carboxy-terminal à partir du 873^{ème} acide aminé et contenant uniquement le bromodomaine, mais ne contenant pas le motif « histone fold ». Cette version tronquée n'est pas en association avec d'autres composants du complexe SAGA. Il a été montré que l'expression des 459 acides aminés du côté carboxy-terminal suffisent pour les interactions de Spt7 dans le complexe SAGA.
- Spt7 (1– 1125) est une version tronquée du côté carboxy-terminal à partir du 1125^{ème} acide aminé. Cette protéine contient le bromodomaine et le motif « histone fold ». Quand on immunoprécipite Spt7(1-1125), on ne constate pas la présence de Spt8 tandis que c'est le cas lors de l'immunoprécipitation de Spt7. Cette observation est cohérente avec le fait que Spt7 (1–1125) est délété de la région interagissant avec Spt8.
- Spt7 (459-1332) est une version tronquée du côté amino-terminal à partir du 459^{ème} codon et est constituée du motif « histone fold » et du domaine d'interaction avec Spt8. La coupure permet une complémentarité structurale avec la protéine Spt7(1 – 873), c'est-à-dire que la coexpression des 2 portions non chevauchantes de Spt7 donc des mutations Spt7(459-1332) et Spt7(1–873), donne un phénotype Spt7 sauvage dans cette souche, ce qui est une complémentation intragénique.

Spt8 est une protéine de 603 acides aminés ayant un rôle dans l'initiation de la transcription par la liaison à la boîte TATA. Cette protéine contient un domaine WD40 bien connu comme domaine d'interaction protéique. Ce domaine, composé de 44 à 60 résidus, contient comme son nom l'indique, un dimère tryptophane-aspartate répété deux fois.

Gcn5 est une protéine de 414 acides aminés qui contient la fonction enzymatique HAT (histone acétyltransférase) du complexe SAGA.

¹ Ces fragments se trouvent dans la littérature sous la notation suivante : Spt7-873, Spt7-1125 et Spt7-100. Pour plus de détails voir article de Winston et al (18).

2.1.3 Le clonage GatewayTM

GatewayTM utilise le principe de recombinaison qui permet l'intégration du phage λ à l'intérieur du génome de *E.coli*, puis son excision pour former un ADN circulaire (figure M4).

D'un point de vue schématique, l'intégration implique la recombinaison entre AttB (site bactérien de recombinaison) et le site AttP (site de recombinaison du phage). Cette réaction BP permet l'insertion de l'ADN du phage dans le génome *E.coli*.

Celle-ci fait appel à deux enzymes qui sont l'intégrase du phage (produit du gène *int*) et la protéine bactérienne IHF (integration host factor).

Une deuxième réaction (de type excision) nommée LR permet l'excision de l'ADN phagien du génome bactérien. La réaction LR a besoin aussi des deux protéines de la réaction BP mais aussi une autre enzyme de phage l'excisionase (produit du gène *XIS*).

Le clonage Gateway se réalise en trois étapes (figure I5) (16).

D'abord, l'ORF est flanqué de deux sites attB légèrement différents (attB1 et attB2).

Cette première étape est réalisée au moyen d'une réaction PCR en utilisant une paire d'amorces dont les extrémités flottantes sont constituées par les séquences attB1 et attB2.

Ensuite, ces sites attB sont utilisés lors de la recombinaison du vecteur donneur qui possède une région échangeable, flanquée des sites attP1 et attP2.

Les sites attB1 et attB2 sont homologues mais légèrement différents, donc ils ne pourront recombiner respectivement qu'avec attP1 et attP2.

On obtient dès lors, des clones d'entrée où l'ORF est flanquée de sites attL1 et attL2.

Enfin, l'ORF contenue dans le vecteur d'entrée pourra être clonée dans toute une série de vecteurs de destination (dans notre cas, le vecteur contenant le domaine de liaison du facteur de transcription Gal 4 et un marqueur de résistance à l'ampicilline a été choisi pour abriter les différentes ORFs testées) par recombinaison entre les sites attR (vecteurs de destination) et les sites attL (clone d'entrée).

Pour chaque étape, il y a toutes les enzymes nécessaires contenues dans un mix communément appelée « clonase » pour le système de clonage.

Le système GATEWAY permettra de cloner les différents ORFs des protéines que nous voulons utiliser comme appât dans le test double - hybride.

1. Vue d'ensemble de la procédure et des résultats obtenus.

Un des thèmes du laboratoire URBM est la transcription chez *Saccharomyces cerevisiae*. Dans ce contexte, la fonction du complexe SAGA est un des objets d'étude dont le but est de trouver la fonction des différentes protéines qui composent le complexe. Pour cela, on choisit de rechercher les partenaires d'interaction de ces protéines par la technique du double-hybride. Dans le cadre de ce mémoire, nous réalisons des expériences double-hybride pilotes c'est-à-dire à petite échelle (de l'ordre de 500 000 transformants) afin de déterminer quelles protéines seraient utilisables dans le cas d'un crible saturant (10 millions transformants). En effet, un crible produit un certain nombre de candidats, variable, selon la sévérité (« Stringency ») appliquée au crible. Comme l'étape première qui suit l'obtention des clones candidats est le séquençage, il est clair qu'il faut adapter la « stringence » du crible à un nombre total de candidats qui puisse raisonnablement sans coût prohibitif être soumis au séquençage. Les différentes étapes de ce travail sont illustrées figure R1.

1.1 Construction des 5 appâts : Gcn5, Spt8, Spt7(1-1125), Spt7(1-873) et Spt7(459-1332) par le clonage GATEWAY™.

Pour réaliser un crible double-hybride, il est nécessaire de construire les vecteurs appâts. Un vecteur appât est un plasmide multicopie (vecteur pGBT9 voir point 1.4.3.2 Matériels et méthodes) qui possède l'ORF de la protéine d'intérêt fusionné au domaine de liaison à l'ADN (BD) du transactivateur GAL 4. (pour plus de détails voir le point 2.1.2 de l'introduction et la figure I3.)

Les ORFs choisies sont Gcn5, Spt8, Spt7(1-1125), Spt7(1-873) et Spt7(459-1332). Différents fragments de la protéine native Spt7 ont été réalisés par Fred Winston (18). Comme le montre la figure I5, Spt7(1-873) contient une région qu'on appelle communément « bromodomaine ». Spt7(459-1332) contient une région d'interaction avec Spt8 et un domaine qui est structurellement similaire au domaine « histone fold ».

Spt7 étant une longue protéine de 1337 acides aminés ne sera pas utilisée pour cette raison in toto. On sait d'expérience que des protéines de cette taille fonctionnent mal en double-hybride. Ainsi, lors du crible double-hybride réalisé avec les sous unités de la polymérase III, les auteurs ont constaté que des fragments des grandes sous unités étaient pêchées quand on utilisait les petites comme appât mais pas inversement (20).

Ces différentes protéines appâts ont été clonées par la technique de GATEWAY™ expliquée en détails au point 2.1 du matériel et méthodes et illustrée à la figure I5.

Ensuite, ces constructions sont transformées dans la souche Y190.

1.2 Test d'élimination des autoactivateurs.

Ce qu'on entend par test d'élimination, est le fait qu'on élimine les protéines appâts qui activent seule la transcription de gènes rapporteurs (la figure R2). Seules les protéines appâts qui ne sont pas des autoactivateur seront utilisées dans des tests double-hybride.

Deux gènes rapporteurs sont utilisés, *LacZ* et *HIS3*.

Le gène *LacZ* code pour la β -galactosidase qui est une enzyme de l'opéron lactose. En présence du substrat X-GAL, l'enzyme si elle est exprimée, clive cette substance en deux produits. Un de ces deux composés est le 5-bromo-4-chloro-indol qui confère une coloration bleue aux levures qui expriment le gène *LacZ*. Ce système, mieux connu sous le nom de test β -gal ou blanc/bleu permet de visualiser la transcription du gène *lacZ*.

Le gène *HIS3* code pour une enzyme impliquée dans la voie de synthèse de l'histidine. La plupart des protéines de fusion (GAL4BD-X) sont capables d'activer par elles-mêmes la transcription de ce gène rapporteur, ce niveau basal de transcription est ce qu'on appelle le bruit de fond. On utilise du 3AT (triaminotriazole) qui est un inhibiteur compétitif de l'enzyme encodée par le gène *HIS3* pour diminuer le niveau de transcription basal.

On considère que nos appâts sont des autoactivateurs quand la souche contenant le vecteur appât a une croissance jusqu'à 200mM 3AT et active la transcription du gène *LacZ*. On ne dépasse pas, dans le test, le seuil de 200mM car au-delà la concentration en 3AT a un effet toxique sur la souche utilisée.

L'utilisation du 3AT est aussi nécessaire lors d'un crible double-hybride car il permet de minimiser le bruit de fond dû à la transcription basale du gène *HIS3*. Ce bruit de fond influence le signal reçu lors du test double-hybride. Pour diminuer cela, il faut déterminer la concentration optimale à ajouter dans le milieu. Pour cela, le test est fait sur une série de milieux de concentration croissante en 3AT (0, 25, 50, 100 et 200mM).

1.2.2 Résultats du test d'élimination des autoactivateurs.

En pratique, les constructions pGBT9-Spt7, pGBT9-Spt7(1-873), pGBT9-Spt7(1-1125), pGBT9-Spt7(459-1332) et pGBT9-Spt8 ont été transformées dans la souche Y190 (cfr point 1.4.2 du Matériel et méthodes) et ont ensuite été striées sur un milieu sans tryptophane, sans uracile pour le test de coloration et dépourvu d'histidine pour le test du gène *HIS3*.

Comme il est montré à la figure R3, les protéines appât Spt7(1-873), Spt7(459-1332), Spt7(1-1125) et Gcn5 n'activent pas d'elles-mêmes la transcription du gène *LacZ* tandis que Spt8 l'active.

La figure R4 et le tableau R1 montrent les résultats pour le gène *HIS3*. On constate que les souches :

- Y190-pGBT9-Spt7(1-873), Y190-pGBT9 Spt7(459-1332) ont une croissance pour une concentration de 3AT variant de 0 à 100mM dans le milieu.
- Y190- pGBT9-Spt7(1-1125) sur des milieux de concentration en 3AT variant entre 0 et 50mM.
- Y190-pGBT9-Gcn5 a une croissance sur des milieux de concentration variant de 0 à 25mM.
- Y190-pGBT9-Spt8 a une croissance sur des milieux de concentration variant entre 0 et 100mM.

Au vu de ces résultats, on constate que les appâts Spt7(1-873), Spt7(459-1332), Spt7(1-1125) et Gcn5 ne sont pas des autoactivateurs et qu'ils peuvent être utilisés dans un crible double-hybride ; en revanche, Spt8 est éliminé de la suite de l'expérience.

Le test d'élimination a aussi permis de déterminer la gamme de concentration de 3AT pour les différents appâts lors d'un crible.

Parmi ces différentes concentrations, on a choisi une valeur pour chaque appât afin de réaliser l'expérience double-hybride.

Pour Spt7(1-873) et Spt7(459-1332), la gamme de concentration se trouve comprise entre 100 et 200mM et pour Spt7(1-1125), elle est comprise entre 50 et 200mM.

Il a été arbitrairement convenu d'utiliser une concentration de 150mM pour réaliser une expérience double-hybride avec ces appâts.

Pour Gcn5, la gamme de concentration est comprise de 25 à 200mM. On a choisi, pour cette protéine, la valeur de 100mM pour la suite de l'expérience.

On utilise des contrôles pour ce test d'élimination des autoactivateurs.

Dans le cas du gène *LacZ*, le contrôle positif est un couple de protéines qui interagissent. Ces protéines sont Spt8 et TFIIS (codée respectivement par le pACT2-227 et par le pAS-pPR2). Le contrôle négatif est la souche transformée par le vecteur pGBT9 sans insert donc contenant le domaine de liaison BD de GAL4 mais sans ORF.

Pour le gène *HIS3*, deux souches sont utilisées comme contrôle interne de croissance. On connaît la concentration de 3AT qui engendre une absence de croissance de ces souches.

Ces souches sont :

- Y190-pAS-RpA12 (le vecteur code pour une sous unité de la polymérase I) a une croissance jusqu'à 50mM de 3AT
- Y190-pGBT9-DIM (dont le vecteur code pour la protéine DIM) qui est sensible à une concentration de 25mM de 3AT.

1.3 Expériences double-hybride pilotes pour Gcn5, Spt7(1-1125), Spt7(1-873) et Spt7(459-1332).

Les expériences double-hybride pilotes pour Gcn5, Spt7(1-1125), Spt7(1-873) et Spt7(459-1332) ont pour but de tester une première fois le système avec environ 500 000 transformants. Puis en effectuant le rapport entre le nombre d'interactants et le nombre de transformants, on peut estimer les résultats qu'on obtiendrait lors de la réalisation d'un crible saturant c'est-à-dire comprenant 10 millions de transformants. Pour des raisons de faisabilité pratique, conditionnée par le coût du séquençage, le nombre total de candidats dans l'expérience pilote devrait être inférieur à 20.

Pour expliquer les expériences réalisées avec les protéines d'intérêt, le cas du test double-hybride avec Gcn5 comme appât est illustré à la figure R5.

La figure R5A montre le test β -gal de cinq transformants du test double-hybride avec Gcn5 comme « appât ». La figure R5B montre le test de croissance sur un milieu sans histidine avec une concentration de 100mM en 3AT.

De ces deux figures, on remarque que sur les cinq transformants isolés, trois clones répondent positivement aux deux gènes rapporteurs ; on convient de retenir seulement ceux-ci comme interactants.

Le tableau R2 montre un récapitulatif des tests double-hybride réalisés avec les protéines de fusion Gcn5, Spt7(1-1125), Spt7(1-873) et Spt7(459-1332) comme « appât ».

Il reprend pour chaque test l'efficacité de la transformation, le nombre de transformants et le nombre retenu comme interactants c'est-à-dire les transformants répondants aux deux gènes rapporteurs.

Lors d'un test double-hybride, trois cas de figures peuvent être envisagés :

- Soit on n'a aucun interactant. Cela signifie que le test est trop « stringent ». Il faut donc diminuer la concentration en 3AT.
- Soit le nombre d'interactants est supérieur à 20 et on peut supposer dans ce cas que l'on a en surplus détecté des interactions non spécifiques. Il faudra recommencer le test avec une concentration en 3AT plus élevée.
- Soit on a un nombre d'interactants qui est inférieur ou égal à 20. Cette situation est choisie pour la réalisation du crible saturant.

Etant donné les résultats montrés au tableau R2, il faut constater que les tests pour les appâts Gcn5 et Spt7(1-873) sont corrects et permettent d'envisager la réalisation d'un crible à plus grande échelle c'est-à-dire, couvrant 10 millions de transformants.

En effet, cette expérience, si on extrapole les chiffres du tableau R2 à 10 millions pour le test avec Gcn5, donnerait 236 clones isolés et environ 100 interactants.

Pour le test avec Spt7(1-873) comme appât, l'extrapolation de l'efficacité de transformation à 10 millions donnerait 1021 clones isolés et environ 128 interactants.

Ce nombre d'interactants, respectivement pour Gcn5 et Spt7(1-873), permet de dire que les interactants isolés pourraient aboutir à des résultats significatifs.

Pour les tests double-hybride avec Spt7(1-1125) et Spt7(459-1332), il semblerait que les conditions expérimentales doivent être redéfinies car si on extrapole l'efficacité de transformation des deux tests à 10 millions, on constate que pour Spt7(1-1125) cela donnera 128 clones isolés et toujours aucun interactant et pour Spt7(459-1332), il y aura 700 clones isolés dont 483 interactants.

Dans le cas de Spt7(1-1125), il semble nécessaire de diminuer la concentration en 3AT utilisée lors de l'expérience double-hybride en passant de 150mM à 100mM de 3AT.

En effet, dans la figure R4, on constate déjà un retard de croissance de la souche à 50mM de 3AT.

Dans le cas de Spt7(459-1332), on constate par l'extrapolation qu'il y a un nombre élevé de clones isolés et 483 interactants.

En fait, il serait impossible de gérer une si grande quantité d'interactants au laboratoire. De plus, on peut supposer qu'un tel nombre d'interactants serait en fait composé de beaucoup de faux positifs. Donc, il serait judicieux d'accroître la concentration afin d'augmenter la « stringence » de ce test.

En conclusion, les expériences double-hybride pour les protéines Spt7(1-1125) et Spt7(459-1332) doivent être reproduites avec une nouvelle concentration en 3AT.

Pour les expériences double-hybride avec les protéines Gcn5 et Spt7(1-873), étant donné les résultats, il est envisagé de réaliser des cribles double-hybride à grande échelle (10 millions de transformants).

Ceci permettra non seulement de détecter des partenaires potentiels d'interaction mais aussi, s'il y a suffisamment de clones indépendants, cela pourrait déterminer la région interagissante sur la protéine qui interagit. Il faut se rappeler en effet qu'étant donné la manière dont la banque de « proies » a été réalisée, elle contient des « fragments » de proies. Par de l'ensemble des clones positifs, pour une interaction, il est possible d'inférer la zone minimale critique pour celle-ci.

A ce jour, toutes les extractions d'ADN plasmidique de tous les clones répondant aux deux gènes rapporteurs ont été réalisées.

Cet ADN plasmidique a été amplifié dans KC8 puis le plasmide « proie » a été extrait par minipréparation d'ADN.

A long terme, il sera nécessaire de réaliser les contrôles double-hybride ad hoc et de confirmer les interactions découvertes par d'autres techniques comme la chromatographie d'affinité, la co-immunoprécipitation ou les protéines chips.

Résultats, discussions et perspectives

2. Conclusions des résultats, discussions et perspectives du travail.

2.1 Résumé des résultats.

Le but de ce mémoire est de tester certaines protéines du complexe SAGA afin de trouver des interactions internes et externes au complexe.

Lors de ce travail, différentes protéines du complexe SAGA ont été utilisées comme appât dans des expériences double-hybride pilotes.

Il s'agit des protéines Gcn5 et des versions tronquées de Spt7.

Au terme de ce mémoire, les résultats obtenus sont le clonage des ORFs dans un vecteur double-hybride, le test d'élimination des autoactivateurs qui a permis d'exclure Spt8 de la suite des opérations et les expériences double-hybride pilotes pour Spt7(1-873), Spt7(459-1332), Spt7(1-1125) et Gcn5.

2.2 Discussions des expériences pilotes double-hybride.

Grâce aux données des tests réalisés, on conclut qu'il est possible d'envisager un crible double-hybride pour Spt7(1-873) et Gcn5 vu le nombre de candidats produits dans l'expérience(cfr tableau R2).

En revanche, pour Spt7(1-1125), il y a lieu de considérer un nouveau test pilote double-hybride. Il est vrai que Spt7(1-1125) donne un long peptide, seulement 207 acides aminés de différence par rapport à la protéine native Spt7 et ceci peut avoir un effet négatif sur la technique mentionnée plus haut (voir point 1.1 page 14). De plus, il serait nécessaire de diminuer la concentration en 3AT dans le milieu.

Pour Spt7(459-1332), on constate qu'il faut accroître la concentration en 3AT afin d'augmenter la « stringence » du test.

Par ailleurs, certaines interactions répertoriées dans la littérature sont intéressantes à rapprocher de nos données..

Par exemple, il est montré (1) par la technique double-hybride que Ada 2 interagit directement avec Ada 3 et Gcn5 pour la modulation de l'activité histone acétyl transférase (HAT) de SAGA.

Il est également montré que Spt7, Spt20 et Ada 1 interagissent pour maintenir l'intégrité du complexe (18).

Citons aussi, SLIK/SALSA qui est un complexe SAGA dépourvu de Spt8 et dépourvu du côté carboxy terminal de Spt7, permettant l'interaction avec Spt8 ; il est montré que le côté amino-terminale de Spt7 contenant le domaine histone fold maintiendrait les entités du complexe dans le cas de SALSA et même celui de SAGA (18, 14).

Il est aussi montré que les sous unité Spt3 et Spt8 interagissent avec une région de Spt7 et ceci aurait un effet positif sur un groupe de promoteurs.

Il a été aussi démontré qu'il existe un homologue de SAGA chez l'homme. Ce complexe est appelé STAGA et possède différentes formes ayant des fonctions distinctes. De plus, il semble que la région carboxy-terminale de Spt7 et la région d'interaction avec Spt8 sont conservées. Ceci pourrait suggérer un maintien de la composition du complexe parmi les eucaryotes.

2.3 Expériences complémentaires à envisager.

A court terme, il est indispensable de terminer le séquençage des clones isolés pour les tests double-hybride avec Gcn5 et Spt7(1-873) et de réaliser le crible à plus grande échelle afin d'obtenir un plus grand nombre de clones indépendants permettant de déterminer une région précise des protéines interagissantes. Il faut aussi redéfinir les conditions du test double-hybride pour les protéines Spt7(1-1125) et Spt7(459-1332). Ceci pourrait permettre de réaliser un nouveau test double-hybride avec ces appâts.

A moyen terme, il faut mettre les candidats double-hybride à l'épreuve par d'autres techniques, par exemple en réalisant des Co-IP et de la chromatographie d'affinité. On peut aussi tenter de se faire une idée d'un possible réseau interactions, peut être transitoire, comportant les candidats identifiés. Ainsi, on peut comparer quels partenaires d'interaction sont communs ou non à différents appâts comme par exemple avec les fragments de Spt7. On peut essayer de faire un lien avec la présence ou l'absence de régions comme le bromodomaine dans l'interaction.

Enfin, à plus long terme, l'approche pilote utilisée peut être réitérée pour l'ensemble des sous unités du complexe ; car les sous unités Spt3 et Spt20 sont déjà clonées et en cours de vérification au laboratoire.

Un test double-hybride à grande échelle devrait permettre de détecter des partenaires potentiels des différents appâts utilisés et dans le cas particulier des versions tronquées de Spt7 de déterminer une relation entre un domaine précis de Spt7 et une région distincte du partenaire impliqué.

En réalisant ce test avec toutes les sous unités du complexe SAGA, on pourrait mettre en évidence de nouveaux acteurs. Les interactions découvertes et leur implication dans la régulation de la transcription chez *cerevisiae* pourraient se poursuivre par les approches classiques de création de mutants. Les informations obtenues seraient généralisables dans la mesure où la structure du complexe est conservée parmi les eucaryotes.

Matériel et Méthodes

1. Matériels

1.1. Les tampons.

Nom	Composition	Concentration	Procédure
Tampon K_2PO_4	$K_2PO_4 + 3H_2O$	1M	Peser 114,14g et porter à un volume de 500 ml avec de l' H_2O distillée puis autoclaver.
Tampon KH_2PO_4	KH_2PO_4	1M	Peser 68,045g et porter à un volume de 500 ml avec de l' H_2O distillée puis autoclaver.
Tampon K- PO_4 pH 7,0	K_2PO_4 KH_2PO_4	61,5ml 1M 38,5ml 1M	Mesurer chaque volume, mélanger les 2 solutions.
Tampon de lyse	Triton SDS NaCl Tris EDTA	2% 1% 100mM 10mM 1mM	Mélanger ces composants et homogénéiser la solution.
Tampon S1 (Kit)	Tris EDTA pH 8,0	50mM 10mM	Solution du kit nucléospin. Une solution de Rnase A est ajouté pour atteindre une concentration finale de 400µg/ml et conservé à 4°C.
Tampon S2 (kit)	NaOH SDS	200mM 1%	Solution du kit nucléospin
Tampon S3 (kit)	Kac pH 4,8	2,55mM	Solution du kit nucléospin
Tampon TAE 10X (gibco BRL)	Tris-Acétate EDTA	400mM 10mM	
Tampon TE 10x	Tris-HCl EDTA pH 8,0	100mM 10mM	

1.2. Les solutions.

Acide aminé et base azotée 100x

Adénine sulfate	0,2 g
Uracile	0,2 g
L-Tryptophane	0,2 g
L-Histidine-HCl	0,2 g
L-Leucine	0,3 g

Porter, séparément, à un volume de 100 ml avec de l'eau distillée puis autoclaver.
Conserver le tryptophane à 4°C et à l'abris de la lumière afin d'éviter sa dégradation.

ADN de sperme de saumon (SS-DNA)

SS-DNA 2 mg

Dissoudre dans 1ml de TE 1x. Passer 20x dans une seringue pour réduire la taille des brins grâce aux forces de cisaillement. Stériliser par filtration sur filtre millipore 0,22 µm. Conserver à - 20°C.

Avant chaque utilisation, dénaturer à 100°C pendant 5 min puis mettre sur glace.

Agarose

Agarose 0,5; 1 ou 2 g

Porter à un volume de 100 ml avec du TAE 1x. Porter à ébullition et laisser refroidir à une température de 55°C. Couler ensuite le gel sur un support approprié.

Ampicilline 10% (solution concentrée 1000x)

Ampicilline 100 mg

Porter à un volume de 1 ml avec de l'eau distillée puis stériliser par filtration sur filtre millipore 0,22 µm. Conserver à -20°C. Ne pas ajouter à des milieux ayant une température supérieure à 55°C afin de ne pas dégrader l'antibiotique.

Kanamycine 10% (solution concentrée 1000x)

Kanamycine 100 mg

Porter à un volume de 1 ml avec de l'eau distillée puis stériliser par filtration sur filtre millipore 0,22 µm. Conserver à -20°C. Ne pas ajouter à des milieux ayant une température supérieure à 55°C afin de ne pas dégrader l'antibiotique.

Polyéthylène glycol (PEG) 50 %

PEG 4000 50 g

Porter à un volume de 100 ml avec de l'eau distillée, filtrer sur filtre millipore 0,45 µm.

SOC

Tryptone 2 %

Yeast extract 0,5 %

NaCl 10 mM

KCl 2,5 mM

MgCl₂ 10 mM

Glucose 20 mM

Autoclaver, ensuite ajouter du MgSO₄ (filtré stérilement) jusqu'à une concentration de 10 mM.

Solution de 3AT 2M

3AT 42,04 g

Porter à un volume de 250 ml avec de l'eau distillée, stériliser par filtration avec un filtre millipore de diamètre de 0,22 µm. Conserver à 4°C.

Solution de LiAc 1M

LiAc 10,2 g

Porter à un volume de 100 ml avec de l'eau distillée et autoclaver.

SDS 10%

SDS 10 g

Dissoudre dans 100 ml d'eau distillée.

Solution de X-GAL 2%

X-GAL 20 mg

Dissoudre dans 1 ml de NN' diméthylformamide. Conserver à -20°C.

1.3 Milieux de culture.

1.3.1. Milieux de culture bactérien.

1.3.1.1. Milieu LB

Tryptone	10 g/l
NaCl	5 g/l
Yeast Extract	5 g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée puis autoclaver 20 min à 120°C, pour obtenir un milieu solide, ajouter de l'agar à une concentration de 20g/l . Laisser refroidir le milieu à une température de 55°C et couler les boîtes de Petri. Conserver celles-ci à 4°C.

1.3.2. Milieux de culture pour les levures.

1.3.2.1. Milieu Casa liquide : milieu riche sans tryptophane, uracile, adénine, tyrosine

Yeast nitrogen base (sans acides aminés)	6,7 g/l
Hydolyat de caséine	1,0 g/l
Glucose	20 g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée et autoclaver 20 min à 120°C, pour obtenir un milieu solide ajouter de l'agar à une concentration de 20g/l. Laisser refroidir le milieu à une température de 55°C puis couler dans des boîtes de Pétri, et les conserver à 4°C. Ajouter l'adénine, le tryptophane, la tyrosine et l'uracile à partir des solutions 100x selon le milieu désiré avant de couler les boîtes.

1.3.2.2. Milieu synthétique

Yeast Nitrogen Base w/o amino acids	6,7 g/l
Glucose	20 g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée et autoclaver 20 min à 120°C, pour obtenir un milieu solide ajouter de l'agar à une concentration de 20g/l. Laisser refroidir le milieu à une température de 55°C puis couler dans des boîtes de Pétri, et les conserver à 4°C. Ajouter les acides aminés stérilement à partir des stocks de concentration 100x en fonction du milieu sélectif désiré avant de couler les boîtes.

1.3.2.3. Milieu synthétique + 3AT.

Préparer un milieu synthétique solide ne contenant pas d'histidine, autoclaver 20 min à 120°C et laisser refroidir le milieu à une température de 55°C. Ajouter le 3AT en fonction de la concentration désirée . Couler le milieu dans des boîtes et conserver à 4°C

1.3.2.4 Milieu minimum M9.

Autoclaver 150ml eau contenant d' 3% d'agar(4,5g) et laisser refroidir à 55°C

Faire préchauffer à 55°C un mélange contenant :

- 100ml eau distillée stérile
- 15ml de mix M9 20x
- 30ml de mix d'acides aminés 10x :
- 3ml de glucose 20% : réalisation de 200ml à autoclaver.
- 1ml d'histidine 1% : réalisation de 100ml à autoclaver.
- 1ml de tryptophane 1% : réalisation de 100ml à autoclaver, à conserver à 4°C et à l'abri de la lumière.
- 1ml d'uracile 1% : réalisation de 1ml à autoclaver
- 0,3ml thiamine 1M : réalisation de 100ml (33,73g) à autoclaver.

Mélanger les solutions précédentes et ajouter :

- 0,3ml MgSO₄ 1M : réalisation de 100ml(12,09g) à autoclaver.
- 0,3ml CaCl₂ 0,1M : réalisation de 100ml(1,47g) à autoclaver.
- 0,3ml ampicilline.

Puis couler les boîtes de Pétri et les conserver à 4°C.

Le mix M9 20x est composé de :

12g Na₂HPO₄
6g KH₂PO₄
2g NH₄Cl
1g NaCl

Porter à un volume de 100ml et autoclaver 20min à 120°C.

Le mix d'acides aminés 10x est constitué de :

0,15g adénine 0,15g arginine
2g sérine 0,3g phénylalanine
0,75g valine 0,5g proline
0,5g glutamate 0,15g méthionine
0,25g lysine 1g thréonine
0,3g tyrosine 0,6g aspartate

Porter à un volume de 500ml et autoclaver 20min à 120°C.

1.4 Souches et plasmides.

1.4.1 Souches de bactéries

- DH10B : *F⁻ mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), ϕ80dlacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ(ara,leu)7697, galU, galK, λ⁻, rspL, nupG*

Cette souche possède les caractéristiques suivantes :

- recA1 réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi la recombinaison entre ADN endogène et exogène,
- endA1 améliore le rendement et la qualité des préparations d'ADN plasmidique en diminuant le taux d'endonucléase.

Cette souche est utilisée afin de répliquer des constructions plasmidiques. Elle est mise en culture à 37°C dans du milieu de Luria-Bertani (LB) auquel on ajoute un antibiotique en fonction du marqueur de résistance présent sur le plasmide.

- KC8 : *hsdR*, *trpC9830*, *pyrF ::Tn5*, *hisB463*, *lacDX74*, *strA*, *galU*, *K(3)*

Cette souche, auxotrophe pour la leucine, ne pousse pas sur un milieu sans leucine (Milieu M9). Elle permet dès lors une sélection de plasmide portant le marqueur *LEU2* de *Saccharomyces cerevisiae* grâce à une complémentation hétérospécifique.

1.4.2 Souche de levure :

- Y190: *MATa gal 4 gal 80 his3 trp1-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3, -112 + URA3::GAL-->LacZ, LYS2::GAL(UAS)-->HIS3 cyhR*

La souche Y190 est la souche utilisée lors du crible double hybride. Celle-ci contient deux gènes rapporteurs (*lacZ* et *HIS3*) sous le contrôle d'un promoteur ADH de force moyenne. Cette souche est d'abord transformée par le plasmide appât ensuite lors d'une transformation à grande échelle par la banque de plasmides proies.

1.4.3 Les plasmides :

1.4.3.1 Le plasmide pDONR 202™ :

Ce plasmide multicopie (Figure M1) possède le gène de résistance à la kanamycine et à la gentamicine. Une cassette compatible avec la système GATEWAY™ est présente dans ce plasmide, appelé plasmide donneur, qui permet la réalisation de la réaction BP lors d'un clonage selon la technique GATEWAY™.

1.4.3.2 Le plasmide pGBT9, plasmide « appât » :

Ce plasmide multicopie (Figure M2) possède le gène de résistance à l'ampicilline, un marqueur *TRP1*, un promoteur ADH en amont du gène codant pour le domaine de liaison à l'ADN du transactivateur Gal4, suivi d'une cassette compatible avec le système GATEWAY™ permettant une fusion traductionnelle avec une protéine d'intérêt. Ce plasmide est utilisé comme plasmide « appât » lors du crible double-hybride.

1.4.3.3 Le plasmide pACTII , plasmide « proie »

Ce plasmide multicopie (figure M3) possède le gène de résistance à l'ampicilline, un marqueur *LEU2*, un promoteur ADH en amont du gène codant pour le domaine d'activation du transactivateur Gal4, suivi d'un polylinker permettant de réaliser des fusions entre des protéines et le domaine d'activation de Gal4.

Une banque génomique de levure composée de fragments d'une taille moyenne de 700 pb a été clonée au niveau du polylinker afin de générer les fusions utilisées en double-hybride. Ce plasmide est dès lors utilisé comme plasmide « proie » lors du crible double –hybride.

2.Méthodes.

2.1 Clonage GatewayTM :

2.1.1 Principe:

GatewayTM utilise le principe de recombinaison qui permet l'intégration de l'ADN du phage λ à l'intérieur du génome de *E.coli*, puis son excision pour former un ADN circulaire (figure M4). La réaction BP (intégration) fait appel à deux enzymes.

- L'intégrase du phage (produit du gène int.)
- Protéine bactérienne IHF (intégration host factor)

La réaction LR (excision) a besoin aussi des deux protéines de la réaction BP mais aussi une autre enzyme du phage : l'excisionase (produit du gène XIS).

2.1.2 Le clonage Gateway :

D'un point de vue schématique, l'intégration implique la recombinaison entre les sites attP du vecteur d'entrée et les sites attB qui bordent l'ORF à insérer.

De cette réaction BP produit un vecteur d'entrée avec un insert flanqué de nouveaux sites appelés AttL et AttR.

Une deuxième réaction (de type excision) nommée LR permettra le transfert de l'insert dans un nouveau vecteur de destination de notre choix.

Dans notre cas, le vecteur utilisé contient le domaine de liaison du transactivateur Gal 4 et un marqueur de résistance à l'ampicilline. Ce plasmide a été choisi pour abriter les différentes ORFs testées qui sont :

- Spt7
- Spt7-873
- Spt7-1125
- Spt7-100
- Gcn5
- Spt8

Le clonage Gateway se réalise en trois étapes.(figure I3).

D'abord, l'ORF est flanqué de deux sites attB légèrement différents (attB1 et attB2).

Cette première étape est réalisée au moyen d'une réaction PCR en utilisant une paire d'amorces dont les extrémités flottantes sont constituées par les séquences attB1 et attB2.

Ensuite, ces sites attB sont utilisés lors de la recombinaison du vecteur donneur qui possède une région échangeable flanquée des sites attP1 et attP2.

Les sites attB1 et attB2 sont homologues mais légèrement différents donc, ils ne pourront recombiner respectivement qu'avec attP1 pour attB1 et qu'avec attP2 pour attB2.

On obtient dès lors, des clones d'entrée où l'ORF est flanquée de sites attL1 et attL2.

Enfin, avec l'ORF contenue dans le vecteur d'entrée pourra être clonée l'ORF dans toute une série de vecteurs de destinations (vecteur double hybride contenant le domaine de liaison du facteur Gal 4 par exemple) par recombinaison entre les sites attR (vecteur de destination) et les sites attL (clone d'entrée).

Le système GATEWAY permettra de cloner les différentes ORFs des protéines que nous voulons utiliser comme appât dans ce test double - hybride.

Pour chaque étape, il y a toutes les enzymes nécessaires ressemblant à celle du phage contenues dans un mix communément appelée clonase pour le système de clonage.

2.1.3 En pratique:

Réaction BP :

- BP clonase Mix (2 μ l)

- Tampon BP clonase concentré 5x (2µl)
- Produit PCR de l'insert bordé des sites AttB1 et AttB2 (2µl)
- Vecteur d'entrée : pDONR 201(2µl)
- Eau distillée (2µl)

Réaction LR :

- LR clonase Mix(2µl)
- Tampon LR clonase concentré 5x (2µl)
- Vecteur de destination : pGBT9 (2µl)
- Vecteur d'entrée cloné avec l'insert (2µl)
- Eau distillée (2µl)

Les réactions s'effectuent pendant minimum 20h à 25°C.

2.2 Techniques relatives à l'utilisation de bactéries.

2.2.1 Transformation des bactéries par électroporation.

Cette méthode consiste à soumettre les bactéries à un choc électrique. Cette décharge déstabilise la membrane cellulaire, ce qui entraîne la formation de pores dans celle-ci, permettant ainsi à l'ADN plasmidique de rentrer dans la bactérie.

2.2.1.1 En pratique :

a) Préparation des cellules électrocompétentes

- réaliser une préculture de la souche désirée O/N à 37°C dans 5 ml de LB sous forte agitation
- inoculer 800ml de LB au moyen de la préculture
- incubé à 37°C sous agitation jusqu'à une DO (mesurée à 600 nm) comprise entre 0,5 et 1
- centrifuger la culture 15 min. à 4000 rpm et 4°C
- resuspendre le culot dans 800 ml d'eau stérile à 4°C
- centrifuger la culture 15 min. à 4000 rpm et 4°C
- resuspendre le culot dans 400 ml d'eau stérile à 4°C
- centrifuger la culture 15 min. à 4000 rpm et 4°C
- resuspendre le culot dans 20 ml de glycérol 10% à 4°C
- centrifuger la culture 15 min. à 4000 rpm et 4°C
- resuspendre le culot dans 2 ml de glycérol 10% à 4°C
- aliquoter dans des Eppendorfs
- stocker les cellules à -80°C

b) l'électroporation

- dégeler un aliquot sur glace
- stériliser les cuvettes d'électroporation en les plaçant sous la lampe à UV pendant 3 min
- mettre les cuvettes sur glace
- mélanger dans un Eppendorf 40 µl de cellules et 1 à 10 µl d'ADN
- laisser une minute sur glace
- transférer le mélange dans la cuvette et remettre sur glace
- régler l'électroporateur (Gene Pulser) sur 25 µF ; 2,2 kV et 200 Ω
- placer la cuvette dans la chambre d'électroporation et électroporer
- ajouter immédiatement après l'électroporation 1 ml de SOC

- incuber une heure à 37°C
- étaler sur des boîtes de milieu sélectif

2.3. Techniques relatives à l'utilisation de levures.

2.3.1. Transformation de levures.

2.3.1.1. Transformation par la technique au LiAc.

- faire une préculture O/N diluer dans 50ml de milieu sélectif croissance jusqu'à une DO (mesurée à 600nm) de 0,7 à 0,8.
- centrifuger 5 min à 5000 rpm
- resuspendre le culot dans 25 ml d'eau stérile
- centrifuger 5 min à 5000 rpm
- resuspendre dans 1 ml de LiAc 100mM
- centrifuger à 14000 rpm pendant quelques sec. Retirer le LiAc
- resuspendre dans 400 µl de LiAc 100mM
- prélever 50 µl de cellule par transformation dans un nouveau tube et centrifuger à 14000 rpm pendant quelques sec. Retirer le surnagent.
- ajouter dans l'ordre :
 - 240 µl de PEG 50%
 - 36 µl de LiAc 1M
 - 25 µl de SS-DNA (préalablement dénaturé 5 min à 100°C puis gardé sur glace)
 - 50 µl d'eau + plasmide
- vortexer afin de resuspendre le culot pendant 1min
- incuber 30 min à 30°C
- choc thermique 20 min à 42°C
- centrifuger à 8 000 rpm pendant 30 sec
- resuspendre le culot dans 200 µl d'eau stérile puis étaler sur boîtes de milieu sélectif

2.3.1.2. Méthode de transformation Trafo pour la banque double- hybride.

- Réaliser une préculture dans 25ml de Casa +Adénine toute la nuit
- Centrifuger 5min à 5000rpm, à t° ambiante
- Resuspendre le culot dans YPAD (YPD+adénine) et mettre à DO₆₀₀ comprise entre 0,2 et 0,3 dans un volume de 50ml.
- Incuber à 30°C sous agitation jusqu'à obtenir une DO₆₀₀ comprise entre 0,7 et 0,8
- centrifuger 5 minutes à 5000 rpm, à t° ambiante
- Resuspendre le culot dans 25ml d'eau distillée stérile à t° ambiante
- Centrifuger 5 min à 5000 rpm, à t° ambiante
- Resuspendre le culot dans 3ml de LiAc 100mM stérile. Prélevez 100µl de cellules pour le contrôle négatif(*)
- Centrifuger le reste 5 minutes à 5000 rpm, à t° ambiante et enlever le surnagent.
- Dans un autre tube falcon, mélanger dans l'ordre
 - 2,4 ml de PEG 50%
 - 360µl de LiAc 1M
 - 100µl de SS- DNA préalablement dénaturé 5 min à 100°C et conservé sur glace.
 - 10µl de Banque (1µg/1µl)

730 µl d'eau stérile

- Homogénéiser le mélange en vortexant ,puis l'ajouter aux cellules. Vortexer jusqu' à la resuspension complète des cellules.
- Incuber 30 min à 30°C.
- Choc thermique 30 min à 42°C (mélanger 15 secondes par inversion toutes les 5 min)
- Centrifuger 5 min à 5000 rpm, à t° ambiante.
- Resuspendre dans 2ml d'eau distillée stérile.
- Etaler sur 8 boîtes de milieu sélectif : SD-UWLH + concentration précise en 3AT.
- Pour le calcul d'efficacité, étaler 1/100^{ème}, 1/1000^{ème} et 1/10000^{ème} de la transformation sur un milieu SD-LUW+2A, effectuer le test en double).

(*) : contrôle négatif

- Déposer les 100µl de cellules dans un tube éppendorf stérile.
- Centrifuger 5 min à 14000 rpm, à t° ambiante
- Ajoutez dans l'ordre : 240µl de PEG 50%
36µl de LiAC 1M
5 µl de SS- DNA (remarque ci – dessus)
70µl d'eau distillée stérile
- Vortexer pour resuspendre les cellules
- Incuber 30 min à 30°C
- Choc thermique 20 min à 42°C
- Centrifuger puis retirer le surnagent. Resuspendre les cellules dans 200µl d'eau distillée stérile, puis étaler sur milieu sélectif : SD-UWLH

2.3.2. Coloration X-GAL(pour une petite boîte de Petri).

- préparer 5 ml d'agarose 1% dans de l'eau, faire bouillir et laisser refroidir jusqu'à 50°C
- faire chauffer jusqu'à 50°C 5 ml de tampon K-PO₄ pH 7,0
- mélanger les deux solutions précédentes
- ajouter 0,1 ml de SDS 10%
- ajouter 0,6 ml de NN' diméthylformamide
- ajouter 0,2 ml de X-GAL 2%
- mélanger et couler une surcouche de 10 ml sur la boîte à colorer
- attendre la solidification puis incuber O/N à 30°C

2.4 Techniques relatives à l'ADN.

2.4.1. Extraction d'ADN plasmidique de levures.

- faire une préculture dans 4ml de milieu sélectif
- centrifuger 1 min à 14 000 rpm
- resuspendre le culot dans 100 µl de tampon de lyse
- ajouter 100 µl de bille de verre d'un diamètre de 425 à 600 microns
- ajouter 100 µl de Phénol,chloroforme saturé à l'acide isoamylique (25 : 24 : 1) pH 6,8
- vortexer pendant 2 min
- centrifuger 15 min à 14 000 rpm
- récupérer la phase supérieure et la déposer sur une colonne NUCLEOSPIN.
- centrifuger 1 min à 14 000 rpm
- laver la colonne avec 600 µl de tampon A4(solution du Kit contenant de l'éthanol).
- centrifuger 1 min à 14 000 rpm et puis 2 min
- ajouter 50 µl d'eau sur la colonne afin d'éluer l'ADN, laisser incuber 1min à t° ambiante

- centrifuger 1 min à 14 000 rpm afin d'éluer l'ADN et stocker les échantillons à -20°C.

2.4.2 Minipréparation d'ADN plasmidique.

La méthode consiste dans l'extraction rapide d'ADN plasmidique à partir d'une culture d'E.Coli.

Ce processus se déroule en 4 étapes :

- La lyse alcaline des bactéries (Tampon S1)
- La précipitation des protéines et des débris cellulaires (Tampon S2)
- La précipitation de l'ADN plasmidique (Tampon S3)
- Le lavage et la resuspension de l'ADN plasmidique (éthanol et eau distillée)

Pour cela, le kit Minipreps Nucleospin a été employé selon les recommandations indiquées.

2.4.3. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.

- dissoudre en chauffant une quantité appropriée d'agarose dans du tampon TAE 1x
- ajouter du bromure d'éthidium
- couler le gel dans un support plexiglas
- ajouter un ou deux peignes pour former des puits dans le gel
- laisser le gel polymériser
- enlever les peignes et placer le gel avec son support dans la cuve d'électrophorèse
- immerger complètement le gel dans du tampon TAE
- charger les échantillons(alourdis par une solution colorante à raison de 1/10 du volume final) dans les puits
- charger également dans un ou plusieurs puits un marqueur de taille (ou de masse) approprié (figure M4)
- laisser migrer, de préférence à un voltage supérieur à 100 Volts pour avoir une bonne séparation des différentes bandes d'ADN
- visualiser les bandes d'ADN sous U.V

Attention: il est recommandé d'utiliser des gants pour manipuler tout ce qui est, ou a pu, être en contact avec le bromure d'éthidium ainsi que de se protéger les yeux des rayons U.V. à l'aide d'un casque ou de lunettes en plexiglas

Bibliographie